

Galanin hatása a vazopresszin kiválasztásra patkányban

¹SZTE, JGYPK, TESTNEVELÉSI ÉS SPORTTUDOMÁNYI INTÉZET

²SZTE, TTK, ÖSSZEHASONLÍTÓ ÉLETTANI TANSZÉK

galanin, vazopresszin, folyadék háztartás, ozmotikus stimulus, hisztamin

TUDOMÁNYOS HÁTTÉR

A vazopresszin (VP) egy széles hatásspektrumú hormon. Az általánosan elfogadott nézet szerint a hipotalamusz magnocelluláris régiójában, főleg a nucleus supraopticus és a nucleus paraventriculáris idegsejtjeiben szintetizálódik [1,2]. A szintézist követően neuroszekréciós granulumok formájában, axonális transzporttal, a hipofízisnyélén át jut a hipofízis hátsó lebenyének sejtjeihez a pituiticákhoz [3]. A VP innen jut a vérkeringésbe. E szerint az általánosan elfogadott hipotézis szerint a neurohipofízis (NH), mint a VP raktározás színtere játszik szerepet [4].

A VP kémiai szerkezetét Du Vigneaud és munkatársai [5] határozták meg és sikeresen szintetizálták is. A VP kilenc aminosavból álló nonapeptid, mely egy hat aminosavat tartalmazó gyűrűből és az ehhez kapcsolódó tripeptid-amid oldalláncból épül fel. A VP élettani hatásai közül több is ismeretes. Fő hatásai, hogy antidiuretikus hatásával szerepet játszik a vízháztartásban [6], valamint vazokonstriktort okozva emeli az artériás vérnyomást [7]. Fő biológiai hatásai mellett befolyásolja a tanulási és memória folyamatokat [8], fokozza a bélperisztaltikát [9], és növeli a vércukorszintet [10].

Sportélettani szempontból a VP antidiuretikus hatása a lényeges. E hatása révén a VP fontos szerepet játszik a vízháztartás szabályozásában [6]. A sporttevékenység, az izommunka hőtermeléssel járó folyamat. A keletkező hőtől a szervezetnek meg kell szabadulnia, máskülönben a testhőmérséklet emelkedni kezd, ami a szervezet károsodásához vezethet. A hő izzadás, verejtékezés formájában adja le a test. A verejték minimum 90%-a víz, így az izzadás vízvesztést okoz. Mivel a verejtékkel távozó víz a vérplazmából származik, a vér sűrűsödik, hematokrit-értéke növekszik. Ezzel egyidejűleg a plazma ozmolaritása is növekszik. Ezeket a vérben végbemenő változásokat összefoglalóan hemokoncentrációnak nevezzük. A megnövekedett plazma-ozmolaritás az agyban, a hipotalamusz területén található speciális érzékelő sejteket, az ozmoreceptorokat ingerli. Az ozmoreceptorokból érkező ingerekre reagálva a hipotalamusz aktiválja a hipofízis hátsó lebenyét, ahonnan megindul az ott tárolt VP szekréciója a vérbe. A VP a vérkeringés közvetítésével eljut a vesébe. Ott a víz visszaszívását okozza, mert megnöveli a vese gyűjtőcsatornáinak vízáteresztő képességét. A fokozott víz-visszaszívásból származó víz visszakerül a vérbe, megnöveli a plazma térfogatát és – a vért „hígítva” – lecsökkenti annak ozmolaritását. A VP így igyekszik szabályozni a vízháztartást [11].

A VP termelését és vérbe történő kiválasztását számos külső és belső tényező szabályozza, köztük például a hőmérséklet, a stressz, illetve több – a szervezet által termelt – vegyület (adrenalin, szerotonin, stb.) is. Utóbbiak közé tartozik a galanin.

A galanint (GAL) 1983-ban, Kazuhiko Tatemoto és Viktor Mutt irányításával, a svéd Karolinska Intézet kutatócsoportja fedezte fel. A 29 aminosavból álló, biológiailag aktív peptidet sertésbélből izolálták, teljes aminosav szekvenciája: Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-His-Ala-Ile-Asp-Asn-His-Arg-Ser-Phe-His-Asp-Lys-Tyr-Gly-Leu-Ala-NH₂. A vegyület az N- és C-terminális aminosavai alapján (*glicin* és *alanin*) kapta nevét [12]. Az eltelt 24 évben a patkány [13], a szarvasmarha [14] és számos egyéb faj GAL szekvenciáját meghatározták. A humán GAL-t 1991-ben Bersani és munkatársai [15] izolálták.

A különböző fajspecifikus GAL-ok leggyakrabban 29 aminosavból és amidált C-terminálisból áll. Az N-terminális rész (1–15) aminosav szekvenciája fajoként azonos, a fajra jellemző eltérések a C-terminális szakaszban vannak. Meglepő módon a humán GAL 30 aminosavból áll és C-terminálisa nem amidált, viszont az N-terminális rész megegyezik a többi fajból származó GAL aminosav sorrendjével [16,17].

A GAL felfedezése óta számos élettani hatását leírták: fokozza a növekedési hormont, a prolaktint és a glukagon termelést [18,19], csökkenti az inzulin, szomatostatint és gasztrint kiválasztást [20,21]. Befolyásolja a

pancreas működést [22], a hipotalamusz-hipofízis-pajzsmirigy tengelyt [23]. A központi idegrendszerre gyakorolt hatásai is ismeretesek: módosítja a kognitív működést [24], illetve a memória folyamatokat [25].

A továbbiakban bemutatásra kerülő kísérlet sorozatok elméleti alapja, hogy a GAL jelentős szerepet játszik az NH rendszer működésének, a VP kiválasztásának szabályozásában [26, 27].

Célkitűzés

Kísérleteinkkel a következő kérdésekre kerestünk választ:

1. Van-e különbség a patkány, sertés és humán GAL, valamint a humán GAL különböző fragmenseinek VP szekrécióra gyakorolt hatása között intracerebroventriculáris (i.c.v.) és intravénás (i.v.) adagolás után patkányban?
2. Ozmotikus stimulus [2.5% NaCl oldat adagolása] utáni VP koncentráció változásokat hogyan módosítják a különböző GAL fragmensek és származékok?
3. Hogyan befolyásolja a GAL kezelés a nem-oszmotikus stimulus [hisztamin (HA) adagolása] által előidézett VP koncentráció változásokat?
4. A GAL indukálta VP szekréciós változások kivédhetők-e egy GAL antagonistá vegyület, a galantid (M15) alkalmazásával?

Módszerek

Kísérleteinkhez az Összehasonlító Élettani Tanszék állatházában nevelt, 3–4 hónapos, 180–250 g testtömegű, hím Wistar-patkányokat használtunk. A vizsgált anyagok beadásához a kísérleti állatok jobboldali laterális agykamrájába i.c.v. kanült helyeztünk.

Az alább felsorolt GAL származékok és fragmensek hatását vizsgáltuk. Ezeket dr. Baláspiri Lajos professzor szintetizálta az SZTE ÁOK Orvosi Vegytani Intézetében.

1. GAL (patkány, 1–29)
2. GAL (sertés, 1–29)
3. GAL (humán, 1–30)
4. GAL N-terminális fragmens (humán, 1–16)
5. GAL C-terminális fragmens (humán, 16–30)
6. Galantid (M15) - GAL antagonistá

I.v. kezelés esetén a GAL vegyületeket a laterális farokvénába, 1.0 nmol (3.2 µg) dózisban, 200 µl fiziológiás sóoldatban adagoltuk. I.c.v. bejuttatáshoz Hamilton fecskendőt használtunk és az anyagokat 1 perc alatt adtuk be. A patkány, sertés és humán GAL i.c.v. adagolásakor 100 pmol (0.32 µg) -t használtunk 10 µl fiziológiás sóoldatban. A GAL 1–16 és 16–30 fragmenseket i.c.v. 100 pmol (0.17 µg) /10 µl fiziológiás sóoldat dózisban adtuk. A GAL antagonistá M15 i.c.v. mennyisége 10.0 nmol (22 µg) volt 10 µl fiziológiás sóoldatban feloldva, és 15 perccel a GAL kezelése előtt alkalmaztuk. A kontroll állatok i.c.v. 10 µl fiziológiás sóoldatot kaptak. Az oszmotikus stimulust intraperitoneálisan (i.p.) adagolt 2.5%-os NaCl oldattal idéztük elő (2 ml/100 g testsúly) közvetlenül a GAL származék beadása előtt. A nem-oszmotikus stimulust i.p. HA kezeléssel (0.01 mg/100 g testsúly) idéztük elő, 15 perccel a GAL kezelés előtt. A patkányok dekapitálása és a vérminták gyűjtése minden esetben a GAL kezelés után 30 perccel történt. A VP koncentrációt a vérplazmából határoztuk meg radioimmunoassay (RIA) módszerrel.

Az adatokat az átlagérték és a középérték szórása alapján adtuk meg az egyes kísérleti csoportoknak megfelelően. A kísérletek eredményeit Kruskal-Wallis próbának vetettük alá.

Eredmények

A patkány, sertés és humán GAL, valamint a humán GAL 1–16 N-terminális és 16–30 C-terminális fragmense i.v., vagy i.c.v. adagolást követően nem okozott szignifikáns változást a plazma VP koncentrációjában.

Ozmotikus stimulus, azaz 2.5%-os NaCl oldat adagolása jelentős emelkedést váltott ki a plazma VP szintben (1. ábra). I.c.v. adagolt patkány GAL kivédte a 2.5%-os NaCl okozta plazma VP szint növekedését, i.v. kezelés után a VP koncentráció azonban nem tért vissza a normális szintre. Az előzőleg i.c.v. beadott GAL antagonistá M15 megakadályozta az i.c.v. patkány GAL 2.5% -os NaCl okozta plazma VP szint emelkedésére gyakorolt gátló hatását.

Mivel az i.v. kezelés eredménytelen volt, ezért a sertés és humán GAL, valamint a humán GAL 1–16 és 16–30 fragmens VP szekrécióra gyakorolt hatását csak i.c.v. kezelés után hasonlítottuk össze (2. ábra). 2.5%-os NaCl adagolása után szignifikáns emelkedést tapasztaltunk a plazma VP szintben. Ez a növekedés kivédhető volt sertés, humán, vagy humán GAL 1–16 fragmens i.c.v. kezeléssel. Viszont a humán GAL 16–30 fragmens nem csökkentette a 2.5% -os NaCl oldat okozta VP koncentráció fokozódást.

Az i.p. HA kezelés szignifikánsan emelte a plazma VP koncentrációt. I.v. patkány GAL adagolást követően ez a fokozódás nem változott. I.c.v. patkány GAL csökkentette a HA által előidézett VP szint emelkedését, de a plazma VP koncentrációja magasabb maradt, a kezeletlen kontroll állatokhoz viszonyítva. Az előzetes i.c.v. M15 kezelés megakadályozta, hogy az i.c.v. patkány GAL mérsékelje a HA indukálta plazma VP szint emelkedést (3. ábra).

HA i.p. adagolása után a plazma VP koncentráció magasabb szintre emelkedett, mint az ozmotikus stimulust követően. Sertés, humán, vagy humán GAL 1–16 fragmens i.c.v. kezelés egyaránt csökkentette a HA indukálta plazma VP koncentráció emelkedését, a VP szint azonban ezután is magasabb maradt, mint a kontroll patkányokban. Az i.c.v. humán GAL 16–30 fragmens ebben az esetben is hatástalan maradt (4. ábra).

Eredmények összefoglalása

Kísérleteink eredményeit összefoglalva elmondható, hogy az i.v. adagolt GAL nem befolyásolja a VP szekréciót, az i.c.v. bejuttatott GAL a nem stimulált, bazális VP szintet nem csökkenti. Megfigyeltük, hogy i.c.v. GAL kezelés teljesen kivédi az i.p. beadott 2.5% NaCl okozta plazma VP szint emelkedést. A HA okozta VP szint emelkedést csak részben védte ki az i.c.v. GAL kezelés. Nem találtunk alapvető hatásbeli különbség a patkány, sertés és humán GAL 1–30, ill. az 1–16 fragmense között. Kísérletsorozatainkban a humán GAL C-terminális 16–30 fragmense hatástalannak bizonyult. Tapasztalataink szerint a GAL antagonistá galantind (M15) előkezelés kivédi a GAL okozta VP szekréciós változásokat.

Következtetések

Eredményeink arra utalnak, hogy *in vivo* körülmények között a GAL jelentős szerepet játszik a VP kiválasztás és ezen keresztül a folyadék-háztartás szabályozásában. A GAL molekula biológiai aktív centrumát a GAL 1–16 fragmens tartalmazza.

IRODALOMJEGYZÉK

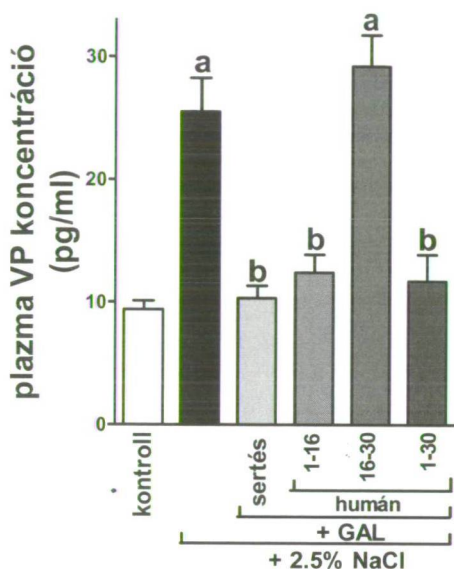
- Rhodes CH, Morrell JI, Pfaff DW. Immunohistochemical analysis of magnocellular elements in rat hypothalamus: distribution and numbers of cells containing neurophysin, oxytocin, and vasopressin. *J Comp Neurol* 1981;198:45–64.
- Swaab DF, Nijveldt F, Pool CW. Distribution of oxytocin and vasopressin in the rat supraoptic and paraventricular nucleus. *J Endocrinol* 1975;67:461–462.
- Jirikowski GF, Sanna PP, Maciejewski-Lenoir D, Bloom FE. Reversal of diabetes insipidus in Brattleboro rats: intrahypothalamic injection of vasopressin mRNA. *Science* 1992;255:996–998.
- Boersma CJ, Van Leeuwen FW. Neuron-glia interactions in the release of oxytocin and vasopressin from the rat neural lobe: the role of opioids, other neuropeptides and their receptors. *Neuroscience* 1994;62:1003–1020.
- du Vigneaud V, Gash DT, Katsoyannis PG. A synthetic preparation possessing biological properties associated with arginine-vasopressin. *J Am Chem Soc* 1954;76:4751.
- Valtin H. Renal actions by which vasopressin may aid the concentration of urine. *Nephrology*, Vol 1 (R R Robinson, ed), pp 397–406, Springer-Verlag, New York 1984.
- Share L. Role of vasopressin in cardiovascular regulation. *Physiol Rev* 1988;68:1248–1284.
- Wied D. Hormonal influences on motivation, learning, and memory processes. *Hosp Pract* 1976;11:123–131.
- Schang JC, Dapoigny M, Devroede G. Stimulation of colonic peristalsis by vasopressin: electromyographic study in normal subjects and patients with chronic idiopathic constipation. *Can J Physiol Pharmacol* 1987;65:2137–2141.
- Rofe AM, Williamson DH. Metabolic effects of vasopressin infusion in the starved rat. Reversal of ketonaemia. *Biochem J* 1983;212:231–239.
- Wilmore J, Costill D. *Physiology of Sport and Exercise*. pp 165–168, HumanKinetics, Leeds, UK 2004.
- Tatemoto K, Rokaeus A, Jornvall H, McDonald TJ, Mutt V. Galanin - a novel biologically active peptide from porcine intestine. *FEBS Lett* 1983;164:124–128.

- Vrontakis ME, Peden LM, Duckworth ML, Friesen HG. Isolation and characterization of a complementary DNA (galanin) clone from estrogen-induced pituitary tumor messenger RNA. *J Biol Chem* 1987;262:16755–16758.
- Rokaeus A, Carlquist M. Nucleotide sequence analysis of cDNAs encoding a bovine galanin precursor protein in the adrenal medulla and chemical isolation of bovine gut galanin. *FEBS Lett* 1988;234:400–406.
- Bersani M, Johnsen AH, Hojrup P, Dunning BE, Andreasen JJ, Holst JJ. Human galanin: primary structure and identification of two molecular forms. *FEBS Lett* 1991;283:189–194.
- Hokfelt T, Bartfai T, Wiesenfeld-Hallin Z. Neuropeptides: Recent Advances with Special Reference to Galanin. *Neurosci Facts* 1992;3:77–78.
- Bartfai T, Fisone G, Langel U. Galanin and galanin antagonists: molecular and biochemical perspectives. *Trends Pharmacol Sci* 1992;13:312–317.
- Bauer FE, Ginsberg L, Venetikou M, MacKay DJ, Burrin JM, Bloom SR. Growth hormone release in man induced by galanin, a new hypothalamic peptide. *Lancet* 1986;2:192–195.
- Bek T, Ottesen B, Fahrenkrug J. The effect of galanin, CGRP and ANP on spontaneous smooth muscle activity of rat uterus. *Peptides* 1988;9:497–500.
- Amiranoff B, Lorinet AM, Lagny-Pourmir I, Laburthe M. Mechanism of galanin-inhibited insulin release. Occurrence of a pertussis-toxin-sensitive inhibition of adenylate cyclase. *Eur J Biochem* 1988;177:147–152.
- Schepp W, Prinz C, Tatge C, Hakanson R, Schusdziarra V, Classen M. Galanin inhibits gastrin release from isolated rat gastric G-cells. *Am J Physiol* 1990;258:G596–602.
- Dunning BE, Ahren B, Veith RC, Bottcher G, Sundler F, Taborsky GJ, Jr. Galanin: a novel pancreatic neuropeptide. *Am J Physiol* 1986;251:E127–133.
- Hooi SC, Koenig JJ, Gabriel SM, Maiter D, Martin JB. Influence of thyroid hormone on the concentration of galanin in the rat brain and pituitary. *Neuroendocrinology* 1990;51:351–356.
- Leibowitz SF. Hypothalamic paraventricular nucleus: interaction between alpha 2-noradrenergic system and circulating hormones and nutrients in relation to energy balance. *Neurosci Biobehav Rev* 1988;12:101–109.
- Mastropaulo J, Nadi NS, Ostrowski NL, Crawley JN. Galanin antagonizes acetylcholine on a memory task in basal forebrain-lesioned rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:9841–9845.
- Kondo K, Murase T, Otake K, Ito M, Kurimoto F, Oiso Y. Galanin as a physiological neurotransmitter in hemodynamic control of arginine vasopressin release in rats. *Neuroendocrinology* 1993;57:224–229.
- Landry M, Roche D, Calas A. Short-term effects of centrally administered galanin on the hyperosmotically stimulated expression of vasopressin in the rat hypothalamus. An *in situ* hybridization and immunohistochemistry study. *Neuroendocrinology* 1995;61:393–404.

MOLNÁR ANDOR, LÁSZLÓ A. FERENC, VARGA CSABA, LÁSZLÓ FERENC

The effect of galanin on the excretion of vasopressin in rats

The 29 amino acid-containing galanin isolated from the porcine intestine is known to play a significant role in the regulation of the function of the hypothalamo-neurohypophyseal system. The basal vasopressin concentration was examined, and also those vasopressin levels following osmotic and non-osmotic stimuli after centrally administered galanin. The effects of rat, porcine and human galanin and the human galanin 1–16 fragment on vasopressin release were studied. Finally, the question was investigated of whether the galanin receptor antagonist galantid (M15) was able to prevent the vasopressin level changes induced by galanin. Galanin administered intravenously did not influence the vasopressin excretion. After the intracerebroventricular (i.c.v.) injection of galanin, the vasopressin level decreased and the enhancement of the plasma vasopressin concentration following intraperitoneal 2.5% NaCl solution or histamine administration was significantly moderated. There was no essential difference in the vasopressin release effects of rat, porcine and human galanins. The human galanin 1–16 fragment proved to be active as concerns vasopressin regulation. Galantid administered i.c.v. before the galanin injection prevented all of the vasopressin-responsive effects of galanin. The results indicate that galaninergic control is of great importance in the regulation of vasopressin secretion.

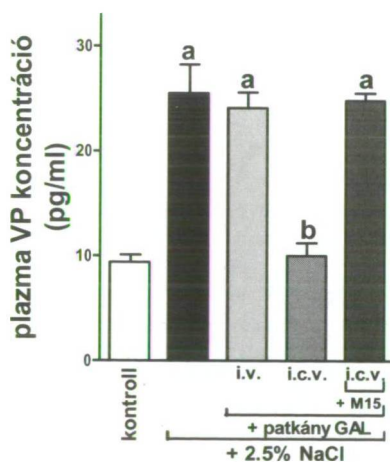


1. ábra

Patkány GAL és GAL antagonistá M15 hatása a 2.5%-os NaCl oldat által kiváltott plazma VP koncentráció változásokra
($n = 8-12$; Átlag \pm S.E.M.);

^a $P < 0.05$, szignifikáns különbség a kontrollcsoporthoz viszonyítva;

^b $P < 0.05$, szignifikáns különbség a 2.5%-os NaCl-kezelt csoporthoz viszonyítva.)



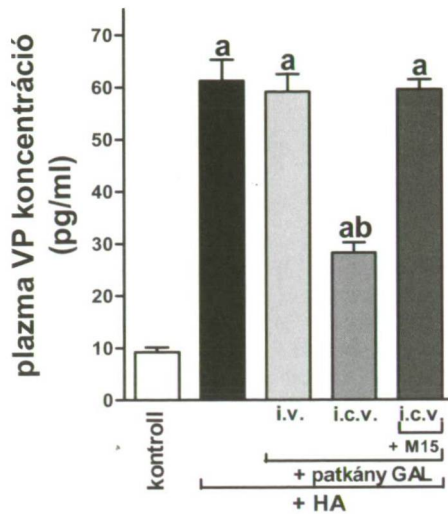
2. ábra

Sertés és humán GAL, valamint a humán GAL 1-16 és 16-30 fragmentjének hatása a 2.5%-os NaCl oldat okozta plazma VP szint emelkedésre

($n = 8-12$; Átlag \pm S.E.M.);

^a $P < 0.05$, szignifikáns különbség a kontrollcsoporthoz viszonyítva;

^b $P < 0.05$, szignifikáns különbség a 2.5%-os NaCl-kezelt csoporthoz viszonyítva.)

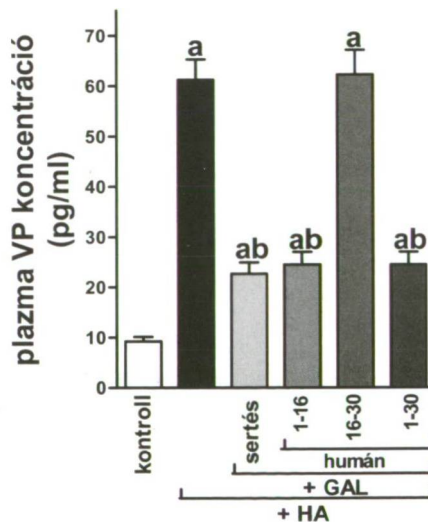


3. ábra

Patkány GAL és GAL antagonistá M15 hatása a HA által kiváltott plazma VP koncentráció változásokra
(n = 8–12; Átlag ± S.E.M.;

^aP < 0.05, szignifikáns különbség a kontrollcsoporthoz viszonyítva;

^bP < 0.05, szignifikáns különbség a HA-kezelt csoporthoz viszonyítva.)



4. ábra

Sertés és humán GAL, valamint a humán GAL 1–16 és 16–30 fragmentjének hatása a HA okozta plazma VP szint emelkedésre

(n = 8–12; Átlag ± S.E.M.;

^aP < 0.05, szignifikáns különbség a kontrollcsoporthoz viszonyítva;

^bP < 0.05, szignifikáns különbség a HA-kezelt csoporthoz viszonyítva.)